

# Tacrolimus (FK506) in experimental pancreas transplantation : Toxicology and immunology studies in the cynomolgus monkey

Citation for published version (APA):

Wijnen, R. M. H. (1997). *Tacrolimus (FK506) in experimental pancreas transplantation : Toxicology and immunology studies in the cynomolgus monkey*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. <https://doi.org/10.26481/dis.19971120rw>

## Document status and date:

Published: 01/01/1997

## DOI:

[10.26481/dis.19971120rw](https://doi.org/10.26481/dis.19971120rw)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.



Summary en Samenvatting

## SUMMARY

*Chapter 1* gives a complete overview of experimental and clinical studies of tacrolimus (FK506) in organ transplantation. It starts with the background and development of tacrolimus. The absorption and distribution, the metabolism and the monitoring of tacrolimus are being discussed in the paragraph concerning the pharmacokinetics of tacrolimus. The paragraph of the pharmacodynamic properties is divided in the intracellular mechanism of action, and in the effects on respectively the T cells, B cells and non-lymphoid cells. After the effects of tacrolimus on organ allografts in animal models, the clinical studies in man are being reviewed. The results in liver, kidney, pancreas, heart, lung and bowel transplantation are discussed in detail. Finally the adverse effects of tacrolimus in man are being discussed.

*Chapter 2* gives a review of tacrolimus in pancreas transplantation. The results of pancreas transplantation with tacrolimus as well in animals as in man are described.

*Chapter 3* is the introduction of the experiments and discusses the results. The first investigation is a dose-finding toxicology study (Chapter 4). In further toxicology studies where we looked to the immunotoxicologic effects of tacrolimus on the germinal centers of the lymphoid tissues (Chapter 5) and on the thymus (Chapter 6). Furthermore we developed an pancreas transplantation model in the Cynomolgus monkey (Chapter 7). The results of the pancreas transplantation study with tacrolimus is described in Chapter 8. Finally the diabetogenic effects of tacrolimus in the Cynomolgus monkey are investigated in Chapter 9.

*Chapter 4* describes a dose finding toxicologic study of tacrolimus in 14 monkeys. Eight monkeys given oral tacrolimus, 1 (n=4) or 10 (n=4) mg/kg daily, survived the 90 days of treatment apparently in good health, as did 2 control monkeys. In contrast, monkeys given intramuscular tacrolimus 1mg/kg daily (n=4) had to be sacrificed at day 20, 25, 32 and 47 because of severe illness. They showed major histopathological changes in the kidney, pancreas, liver, and heart. The most interesting histopathologic finding was the depletion of germinal centers in the periarteriolar lymphocytic areas in the spleen. Because this phenomenon was never described in animal studies of other immunosuppressive drugs, we focussed in the experiments of Chapter 5 to the origin of this effect of tacrolimus in the Cynomolgus monkey.

*Chapter 5* describes the investigation to the effect of supra therapeutic doses of tacrolimus on germinal centers of the lymphoid tissues in the Cynomolgus monkeys, with special regard to the expression of adhesion molecules, LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1, which are involved in the regulation of lymphocyte migration and maturation in the germinal centers of the spleen and lymph nodes. Two groups were being studied: A) 10 mg/kg tacrolimus once a day ( $n=4$ ), and B) control group with placebo ( $n=2$ ). After 80 days the monkeys were sacrificed. A complete postmortem examination was performed in all animals with a microscopical evaluation of spleen, thymus, lymph nodes and tonsils. The results of the study showed that long term oral administration of high dose tacrolimus to Cynomolgus monkeys resulted in a total absence of germinal centers in the spleen and peripheral lymph nodes. Immuno histological staining showed still a reticular network of FDC in the so-called primary follicles, but there was an absence of expression of VCAM-1 and ICAM-1 on the FDC in the spleen and peripheral lymph nodes. The lack of VCAM-1 and ICAM-1 expression on FDC may be explained by the inhibition of regulatory cytokines by tacrolimus.

*Chapter 6* shows the investigation to the immuno toxicologic effect of tacrolimus within the thymus. After 80 days the monkeys were sacrificed and spleen and thymus tissues were collected for (immuno)histochemical and flow cytometric analysis. The thymuses in the control animals showed a normal architecture. Tacrolimus treatment resulted in a marked reduction in size and cellularity of the thymus, especially in the medulla. In (immuno)histochemistry the relative size of the medulla in control animals was 30-40%, whereas in tacrolimus treated animals only 10% was of medullary phenotype. Immunohistological analysis of serial sections of 'medullary areas' of tacrolimus-treated thymuses revealed the presence of thymocytes of immature phenotype ( $CD1+CD4+CD8+$ ) in the absence of interdigitating dendritic cells (IDC) or epithelial cells in these areas. Flow cytometric analysis of single cell suspensions of the thymuses confirmed the histological data. In conclusion, in young adult Cynomolgus monkeys tacrolimus induces thymic medullary atrophy. These effects did not result in clear changes in lymphoid cell populations in spleen and peripheral blood.

The outcomes of the dose finding toxicology study resulted in the selection of a dose regiment for the animals involved in the pancreas transplantation study, which was not severe toxic for the animals but could guarantee enough immunosuppressive effects to study the quality of tacrolimus in preventing rejection of transplanted pancreases in the Cynomolgus monkeys.

*Chapter 7* describes the development of the pancreatic transplantation model in the primate in order to test new immunosuppressive drugs. Initially, streptozotocin was investigated in order to induce insulin-dependent diabetes

mellitus, but it was found to be ineffective and associated with a high morbidity. Therefore, total pancreatectomy with salvage of the duodenum and spleen was introduced and combined with pancreatic allotransplantation as a single procedure. Enteric diversion of the pancreatic juice was chosen since this avoids exocrine pancreatic insufficiency.

*Chapter 8* describes the study to the effect of tacrolimus monotherapy on pancreaticoduodenal allotransplantation in the Cynomolgus monkey. The recipients were made diabetic by total pancreatectomy, thus glycemic control depended on the graft. In control animals hyperglycemia occurred after  $14 \pm 3$  days and the animals died after  $36 \pm 15$  days. For tacrolimus-treated animals, the time until development of hyperglycemia was  $60 \pm 12$  days ( $p < 0.05$ ). The animals were then sacrificed by day 90 ( $p < 0.05$ ). All three control animals lost their graft function because of severe rejection, as verified by postmortem examination. Only one of the five treated animals showed evidence of a moderate-to-severe rejection at 90 days, one animal having a mild rejection as judged by the histological findings. The drug was clinically well tolerated in all except one animal that became apathetic and refused to eat. Thus the use of tacrolimus enables successful pancreatic transplantation in non-human primates.

*Chapter 9* describes the study to effect of tacrolimus on glucose metabolism in five Cynomolgus monkeys after pancreatic transplantation and in 10 non-transplanted Cynomolgus monkeys. It became evident that tacrolimus can induce hyperglycemia in these animals. In the orally treated non-transplanted animals the hyperglycemia was usually very mild (4.5 - 6.0 mmol/L). In one of the five transplanted animals, hyperglycemia was induced by the tacrolimus treatment, since histological signs of rejection were absent and since plasma glucose levels normalized on dose reduction. The glucose disappearance rates, as indicated by the K-values, decreased in the non-transplanted animals as well as in the transplanted group. We concluded that tacrolimus is diabetogenic in the Cynomolgus monkey. This side effect, however, was found to be reversible on dose reduction.

Tacrolimus is an immunosuppressant that displays similar but more potent immunosuppressant properties on a weight basis, than cyclosporine. Tacrolimus demonstrated notably efficacy as a rescue or primary immunosuppressive therapy in recipients of liver or renal allografts and provides a valuable therapeutic alternative for patients experiencing rejection or drug-related toxicity with other immunosuppressive regimens. The place of tacrolimus as primary immunosuppressant may well be considered an alternative option to cyclosporine, particularly in patients undergoing liver transplantation. Although further clinical experience will help define the role of tacrolimus in organ transplantation, it

provides a worthwhile addition to the limited range of immunosuppressants available. When we define cyclosporine A as second generation immunosuppressant, tacrolimus can be regarded as a third generation immunosuppressive drug. Monitoring of the drug is important, because it has a narrow therapeutic window. Especially in pancreas transplantation the balance between diabetogenic side effects and immunosuppression needs careful management. Nevertheless, the last reported clinical results concerning pancreas transplantation with tacrolimus are so improving, that in the future there will be a place for pancreas transplantation in the treatment of some diabetic patients.

## SAMENVATTING

*Hoofdstuk 1* is een review van de meest essentiële experimentele en klinische studies over de effecten van tacrolimus (FK506) in orgaantransplantatie. Als eerste wordt de ontwikkeling van dit nieuwe immunosuppressieve medicijn beschreven. De absorptie en distributie, het metabolisme en de monitoring van tacrolimus zijn beschreven in de paragraaf over de farmacokinetiek. De farmacodynamische eigenschappen zijn onderverdeeld in de intracellulaire werkingsmechanismen van tacrolimus en de effecten van deze stof op T en B cellen. Na beschrijving van de effecten van tacrolimus in orgaantransplantaties in dieren, worden de klinische studies in de mens beschreven. De resultaten van het medicijn in nier-, lever-, hart-, longen-, pancreas- en darmtransplantaties worden gedetailleerd besproken, evenals de bijwerkingen.

*Hoofdstuk 2* geeft een overzicht over de rol van tacrolimus in pancreastransplantatie. De resultaten en diabetogene bijwerkingen van tacrolimus in dieren zowel als in de mens zijn hierin beschreven.

*Hoofdstuk 3* is een introductie van de experimentele studies en stelt de resultaten hiervan ter discussie. Het eerste onderzoek is een toxicologie studie om de effectieve dosis voor een goede immunosuppressieve werking te bepalen (hoofdstuk 4). De hoofdstukken 5 en 6 betreffen een vervolgonderzoek hierop, waarin specifiek is gekeken naar de immunotoxische werkingen van tacrolimus op de kiemcentra van het lymfoïde weefsel (hoofdstuk 5) en op de thymus (hoofdstuk 6). Tevens werd onderzoek verricht naar een bruikbaar pancreas-transplantatie model in de aap. De ontwikkeling hiervan is beschreven in hoofdstuk 7. De pancreastransplantatie studie naar het immunosuppressieve effect van tacrolimus is beschreven in hoofdstuk 8. Het diabetogene effect van het middel in de aap is onderzocht in de studie van hoofdstuk 9.

*Hoofdstuk 4* beschrijft de toxicologie studie die werd verricht om een effectieve niet-toxische dosis te bepalen. Er werden 14 Java apen bestudeerd. De acht apen met tacrolimus dosering per os, 1 (n=4) of 10 (n=4) mg/kg/dag, overleefden de 90 dagen van het experiment in relatief goede gezondheid, vergelijkbaar met de twee controle apen. De vier apen die behandeld werden met intramusculaire toediening van 1 mg/kg/dag tacrolimus moesten op dag 20, 25, 32 en 47 worden opgeofferd ten gevolge van ernstige apathie en anorexie. Er werden ernstige histopathologische veranderingen in de nieren, lever, hart en pancreas gezien. De meest interessante histopathologische observatie was de depletie van B cellen in de kiemcentra van de milt. Omdat dit fenomeen tot op heden nog niet was beschreven in dierex-

perimenteel onderzoek van andere immuunsuppressiva, bestudeerden we specifiek dit effect van tacrolimus in de Java aap (hoofdstuk 5).

*Hoofdstuk 5* beschrijft het experiment met betrekking tot het effect van supra therapeutische dosering van tacrolimus op de B cel follikels van het lymfoïde weefsel in de Java aap. Met name de expressie van LFA-1, ICAM-1, VLA-4 en VCAM-1 werd bekeken, aangezien deze adhesiemoleculen een rol spelen in de regulatie van lymfocytenmigratie en -maturing in de kiemcentra van de milt en van de lymfklieren. Er werden zes apen geïncubeerd; vier werden behandeld met tacrolimus 10 mg/kg/dag per os en twee apen kregen een placebo. Na 80 dagen werden de apen opgeofferd voor (immuno)histopathologische evaluatie van milt, thymus, lymfklieren en tonsillen. De uitkomsten van deze studie laten zien dat langdurige orale dosering van hoge dosis tacrolimus in de Java aap, resulteerde in een afwezigheid van kiemcentra in de milt en in de perifere lymfklieren. Immunohistologie kleuring laat een reticulair netwerk van follikel dendritische cellen zien. Echter, er was geen expressie van VCAM-1 en ICAM-1 op deze cellen in de primaire follikels van de milt en perifere lymfklieren van de behandelde apen. Het ontbreken van VCAM-1 en ICAM-1 expressie op de follikel dendritische cellen kan verklaard worden door een remming van de regulatie van cytokinen door tacrolimus.

*Hoofdstuk 6* beschrijft het immunotoxicologisch effect van tacrolimus op de thymus. Na 80 dagen werden de apen opgeofferd voor immunohistologische en flow-cytometrische analyses van de milt en thymus. De thymus in de controle dieren vertoonde een normale structuur. Tacrolimus behandeling resulteerde in een reductie in grootte en aantal cellen van de thymus. De relatieve grootte van de medulla liet een reductie zien van 30-40% in de controle apen, tot 10% in de behandelde apen. Immunohistologische analyse van de behandelde apen toonde de aanwezigheid van onrijpe CD1+CD4+CD8+ thymocyten en afwezigheid van dendritische en epitheel cellen. Deze data werden bevestigd door cytometrische analyse van celsuspensies van de thymus. Dit experiment liet zien dat de behandeling van Java apen met tacrolimus leidt tot medullaire thymusatrofie.

De uitkomsten van de 'dose finding' toxicologie studie resulteerden in de selectie van een doseringsschema voor de apen die betrokken waren in de pancreastransplantatie studie, die niet ernstig toxisch, maar wel immunosuppressief genoeg was om resectie te voorkomen.

In *Hoofdstuk 7* wordt de ontwikkeling beschreven van een model voor pancreas transplantatie in de aap om nieuwe immunosuppressieve medicijnen ter voorkoming van resectie te onderzoeken. Eerst werd het gebruik van streptozotocine



onderzocht voor de inductie van insuline afhankelijke diabetes mellitus. Dit bleek ineffectief te zijn en gaf een hoge morbiditeit. Daarom werd een model geïntroduceerd waarbij een totale pancreatectomie werd uitgevoerd, waarbij het duodenum en de milt in situ werden gelaten. Na de totale pancreatectomie werd tijdens dezelfde operatie een pancreastransplantatie verricht, waarbij een enterale exocriene drainage van de getransplanteerde pancreas werd verzorgd.

*Hoofdstuk 8* beschrijft het onderzoek naar het effect van tacrolimus monotherapie bij pancreaticoduodenale allotransplantatie in het hierboven beschreven primatenmodel. De ontvangers werden diabeet gemaakt middels een totale pancreatectomie, waardoor de glucoseregulatie afhankelijk was van het transplantaat. De controle apen werden na  $14 \pm 3$  dagen hyperglycemisch en de dieren overleden na  $36 \pm 15$  dagen. De met tacrolimus behandelde apen ontwikkelden hyperglycemie na  $60 \pm 12$  dagen ( $p < 0.05$ ). De drie controle apen vertoonden fulminante resectie bij post-mortem onderzoek. Slechts 1 van de 5 met tacrolimus behandelde apen vertoonde tekenen van matig ernstige resectie na 90 dagen en 1 aap bleek bij histologisch onderzoek tekenen van milde resectie te vertonen. Tacrolimus werd goed getolereerd bij 4 van de 5 apen, 1 aap vertoonde tekenen van apathie en verminderde eetlust. Deze resultaten laten zien dat wij met tacrolimus in staat waren een succesvolle allogene pancreastransplantatie bij de Java aap uit te voeren.

*Hoofdstuk 9* beschrijft het effect van tacrolimus op het glucose metabolisme geëvalueerd in 5 Java apen na pancreastransplantatie en in 10 niet getransplanteerde Java apen. In de niet getransplanteerde apen die tacrolimus per os kregen toegediend, was de hyperglycemie mild ( $4.5 - 6.0$  mmol/L). In 1 van de 5 getransplanteerde apen werd de hyperglycemie geïnduceerd door tacrolimus, aangezien histologische tekenen van resectie afwezig waren en de plasma glucose normaliseerde na reductie van de dosis. De K-waarde van de glucose tolerantie testen daalden zowel in de niet-getransplanteerde als in de getransplanteerde apen. In conclusie blijkt tacrolimus diabetogeen te zijn in de Java aap. Deze bijwerking blijkt reversibel na reductie van de dosis.

Tacrolimus is een medicijn dat dezelfde eigenschappen vertoont als cyclosporine, maar sterkere immunosuppressieve eigenschappen vertoont in vergelijking met cyclosporine. Tacrolimus is zeer effectief in zowel 'rescue' als primaire immunosuppressieve therapie bij ontvangers van lever en nieren, en lijkt een waardevol alternatief voor patiënten die tekenen van resectie of medicijn-gerelateerde toxiciteit vertonen bij andere immunosuppressieve behandelingen. De plaats van tacrolimus als primair immunosuppressivum lijkt ook een goed alternatief voor cyclosporine in levertransplantatiepatiënten. Hoewel eerst verdere klinische

ervaring de rol van tacrolimus in orgaantransplantatie zal moeten definiëren, is het inmiddels al een waardevolle aanvulling op het beperkte aantal immunosuppressiva dat tot op heden klinisch beschikbaar is. Wanneer we cyclosporine beschouwen als een tweede generatie immuno-suppressivum, kan tacrolimus gezien worden als een derde generatie immuno-suppressivum. Monitoring is essentieel, gezien het smalle therapeutische venster. Met name in pancreastransplantatie dient de balans tussen de diabetogene bijwerking en de immunosuppressieve werking zorgvuldig te worden gezocht. De recentelijk gerapporteerde klinische resultaten met betrekking tot pancreastransplantatie met tacrolimus lijken veelbelovend, zodat in de toekomst een groter indicatiegebied bestaat voor pancreastransplantatie als behandeling van moeilijk behandelbare diabetische patiënten.